

microDent®
Extraction et Amplification de l'ADN de Bactéries Responsables de Parodontites

Introduction

Ce protocole décrit la procédure d'amplification des fragments d'ADN bactériens permettant la différentiation par hybridation inverse de cinq bactéries responsables de parodontites.

La PCR est couverte par des brevets détenus par la société Hoffmann-La Roche. Aucune autorisation, licence implicite ou explicite pour la pratique de la PCR ni aucune autre méthode utilisant la PCR ne sont couvertes en cas d'acquisition de cette trousse. Les informations sur l'obtention d'une licence pour la pratique de la PCR ou sur d'autres méthodes utilisant la PCR peuvent être obtenues en contactant F. Hoffmann-La Roche AG, CH – 4002 Basel.

Conservation et Précautions

Dès réception, conserver le mélange Amorces/Nucléotides (PNM) à 2–8°C et isolés de toute source d'ADN potentiellement contaminante. Si la durée de conservation doit excèder 4 semaines, conserver à –20°C. Il est recommandé d'aliquoter le mélange PN afin d'éviter les congélations/décongélations répétées. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.

Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux et être manipulés comme tel. Observer les précautions usuelles pour la préparation de l'amplification. Il est essentiel que le matériel et les réactifs utilisés pour l'extraction de l'ADN et pour la préparation de la PCR soient exempts de DNases. Ne pas mélanger les réactifs provenant de différents lots de trousses.

Matériel Requis mais Non Fourni

- ADN polymérase thermostable avec tampon (taux d'extension > 1 kb/min,demi-vie : 35 min à 97°C, fidélité 2,5–3,0 x 10^{-5})
- Bloc chauffant (précision +/–1°C)
- Centrifugeuse de paillasse
- Eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire)
- Embouts de pipettes stériles avec filtre
- Gants à usage unique
- Huile minérale, niveau de pureté pour Biologie Moléculaire (pour thermocycleur sans couvercle chauffant)
- Kit pour l'extraction de l'ADN et réactifs associés
- Micro-tubes pour extraction de l'ADN (1,5 ml) et tubes pour thermocycleur; exempt de contamination par DNase et RNase
- Pipettes réglables pour 10, 20, 200, et 1000 µl
- Thermocycleur (taux de chauffage : 3°C/sec, taux de refroidissement : 2°C/sec, précision : +/–0,2°C)

Extraction de l'ADN

L'espace de travail doit être exempt de toute trace d'ADN amplifié. Utiliser comme matériel de départ les mèches de papier utilisées pour le prélèvement des échantillons subgingivaux. Les mèches sèches peuvent être conservées au moins 7 jours avant le début de l'analyse. Toutes les procédures d'extraction de l'ADN à partir de bactéries et produisant de l'ADN capable d'être amplifié peuvent être employées. Un protocole détaillé peut être obtenu chez votre distributeur ou à l'adresse internet : http://www.hain-lifescience.de/pdf/dnaisol_paperpoint.pdf

Préparation de la PCR

Préparer le mélange réactionnel (45 µl) dans une pièce exempte d'ADN. L'échantillon d'ADN doit être rajouté dans une pièce séparée.

Préparer le mélange suivant par tube :

- 35 µl de mélange Amorces/Nucléotides (PNM)
- 5 µl de tampon d'incubation de la polymérase 10x – non fourni
- x µl de $MgCl_2$[1] – non fourni
- 1–2 *unité(s)* d'ADN polymérase thermostable (se référer au manuel) – non fourni
- y µl d'eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire) qsp 45 µl (hors volume de l'enzyme) – non fourni
- Ajouter 5 µl de solution d'ADN pour atteindre un volume final de 50 µl (hors volume de l'enzyme)

[1] Selon le système tampon/enzyme utilisé, la concentration optimale de $MgCl_2$ peut varier de 1,5 à 2,5 mM. A noter que certains tampons contiennent déjà le $MgCl_2$.

Déterminer le nombre d'échantillons à amplifier (nombre d'échantillons à analyser + contrôles). Pour un contrôle négatif, par exemple, la solution d'ADN à amplifier est remplacée par 5 µl d'eau (contrôle négatif). Préparer une solution mère de mélange réactionnel contenant tous les réactifs à l'exception de l'ADN, et bien homogénéiser (ne pas vortexer).

Si le thermocycleur ne possède pas de couvercle chauffant, recouvrir les échantillons d'huile minérale.

Profil d'Amplification

5 min[2]	95°C	–	1 cycle
30 sec	95°C	–	10 cycles
2 min	58°C	–	
25 sec	95°C	–	20 cycles
40 sec	53°C	–	
40 sec	70°C	–	
8 min	70°C	–	1 cycle

[2] La durée de cette étape doit être rallongée en cas d'utilisation d'ADN polymérase de type «hot start» (se référer au manuel de l'enzyme).

Selon le thermocycleur utilisé, le profil d'amplification peut demander des modifications (contacter votre distributeur).
Les produits de l'amplification peuvent être conservés à +4 ou –20°C.

La réaction d'amplification peut être contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose 2% en déposant directement 5 µl de chaque échantillon (sans aucun tampon additionnel). Les amplicons ont une taille approximative de 280 pb.

Fabricant

Hain Lifescience GmbH, Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Allemagne
http://www.hain-lifescience.de





microDent®
Test Génétique pour l'Identification Combinée de Cinq Espèces Bactériennes Responsables de Parodontites

Principe

Le test **microDent®** est basé sur la technologie **DNA•STRIP®** qui permet l'identification combinée de cinq espèces bactériennes responsables de parodontites, à savoir *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Bacteroides forsythus,* et *Treponema denticola.* La procédure complète comporte trois phases : extraction de l'ADN à partir d'échantillons de patients (matériel requis pour l'extraction de l'ADN non fourni), une amplification multiplex à l'aide d'amorces biotinylées (ADN polymérase thermostable non fournie), et détection de l'ADN amplifié par hybridation inverse. Cette dernière phase comporte les étapes suivantes : dénaturation chimique de l'ADN amplifié, hybridation des amplicons simples brins biotinylés aux sondes pré-immobilisées sur la membrane, lavage stringent, et enfin addition d'un conjugué streptavidine / phosphatase alcaline suivie d'une révélation chromogénique. Les signaux obtenus sont facilement et rapidement interprétés à l'aide d'une matrice fournie avec chaque trousse.

Précautions

Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux et être manipulés comme tel. Les échantillons prélevés sur des patients à risques doivent être identifiés et manipulés dans des conditions de sécurité adéquates. Suivre les recommandations (fédérale, nationale, locale) d'hygiène, de sécurité et d´environment. Se protéger à l'aide de vêtements adéquats et de gants.

Lors de la manipulation du kit, tenir compte des indications de sécurité suivantes :
La **Solution de Dénaturation** (DEN) contient du NaOH (<2%) et est irritante pour la peau et les yeux (R36/38 et S26, S37/39, S45).
Le **Substrat Concentré** (SUB-C) contient Dimethyl Sulfoxide et est irritante (R36/37/38, S23-26-36).
Pour des informations supplémentaires, consulter les fiches de sécurité.

Contrôle de Qualité

Afin de contrôler le bon déroulement du test et le bon fonctionnement des réactifs, chaque bandelette comporte deux zones de contrôle :

- une zone «Contrôle Conjugué» pour contrôler la fixation du conjugué sur la bandelette et le bon déroulement de la révélation chromogénique
- une zone «Contrôle Amplification» pour contrôler le bon déroulement de l'amplification

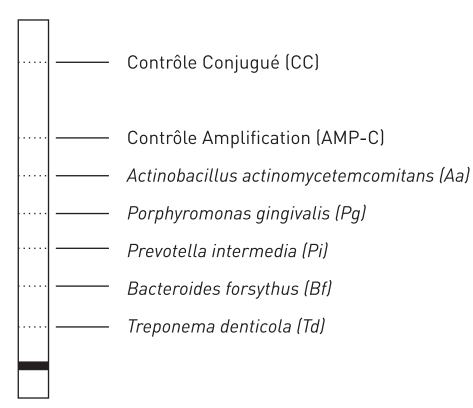
Lorsque l'amplification s'est correctement déroulée, un amplicon de contrôle est produit et vient s'hybrider sur cette zone. Ce contrôle permet de détecter les erreurs éventuelles durant la préparation de la PCR ou la contamination de l'ADN extrait par des inhibiteurs de l'amplification.
Lorsqu'aucune des sondes spécifiques d'espèces (sonde 3–7) ne développe de signaux positifs, les deux zones de contrôle doivent développer un signal positif afin de s'assurer de l'absence de résultats faux négatifs. Sinon, un nouveau test doit être réalisé. Si une plusieurs espèces bactériennes sont détectées, le signal du contrôle d'amplification peut être faible. Il est inutile dans ce cas de répéter le test.

Procédure

Préparation

Préchauffer bain-marie agitateur/**TwinCubator®** à exactement **45°C** +/-1°C. Préchauffer les solutions HYB et STR à 37–45°C avant utilisation. Les réactifs ne doivent présenter aucun précipité (à noter cependant que la solution CON-D est opaque). Si besoin, agiter. Equilibrer les autres réactifs (à l'exception de les solutions CON-C et SUB-C) à température ambiante. Dans un tube approprié, diluer le Conjugué Concentré (CON-C, orange) et le Substrat Concentré (SUB-C, jaune) au 1 :100 dans un volume adéquat du tampon correspondant **(CON-C avec CON-D, SUB-C avec SUB-D)**. Bien homogénéiser et équilibrer à température ambiante. Pour chaque échantillon testé, ajouter 10 µl de concentré à 1 ml de tampon. Diluer CON-C avant chaque utilisation. Une fois dilué, SUB-C reste stable pendant 4 semaines conservé à température ambiante et à l'obscurité.

1. **Déposer 20 µl de Solution de Dénaturation (DEN, bleu) à une extrémité de chaque puit utilisé.**
2. **Ajouter 20 µl d'échantillon amplifié et mélanger les deux solutions par pipetages répétés. Incuber 5 minutes à température ambiante.**
   Pendant ce temps, à l'aide d'une pince, sortir du tube le nombre approprié de bandelettes (STRIPS), et inscrire au crayon leur numéro d'identification dans l'espace situé sous la ligne de repère. Toujours porter des gants pour manipuler



Limitations

En vue de l'amplification, l'ADN doit avoir été extrait à l'aide d'une méthode appropriée. L'ADN cible doit avoir été correctement amplifié.
Le test fonctionne dans les limites de la région du génome choisie pour chaque sonde.

Causes d'Erreurs

Résultats faibles ou absence de signal (incluant la zone de contrôle conjugué)

- Température ambiante trop basse ou réactifs mal équilibrés.
- CON-C et/ou SUB-C trop dilué ou CON-D et/ou SUB-D utilisé sans dilution préalable.

Résultats faibles ou absence de signal, excepté dans la zone de contrôle conjugué

- La qualité et/ou la quantité de l'ADN extrait n'ont pas permis une amplification correcte. Analyser l'ADN amplifié sur un gel agarose 2%. Si aucun amplicon n'est visible, répéter les étapes d'extraction et d'amplification. Essayer éventuellement une autre méthode d'extraction de l'ADN (se reporter au manuel «Extraction et Amplification de l'ADN de Bactéries Responsables de Parodontites»).
- Température d'incubation trop élevée.

Signaux positifs sur toutes les bandelettes

- Température d'incubation trop basse.
- Tampon d'Hybridation et/ou Solution de Lavage Stringent incorrectement équilibrés ou homogénéisés.
- Contamination de l'ADN extrait et/ou des réactifs d'amplification avec de l'ADN précédemment extrait ou amplifié. Lorsque les réactifs d'amplification sont contaminés, un échantillon de contrôle négatif entraîne également le développement des lignes tests.
- Dans certaines conditions de test, une forte concentration d'ADN amplifié peut entraîner une réaction chromogénique très rapide. En pareil cas, afin de prévenir le développement de bandes dues à des réactions d'hybridation croisées, arrêter la réaction chromogénique dès que les premières lignes colorées deviennent visibles.

Coloration non homogène

- Les bandelettes n'ont pas été suffisamment immergées lors des différentes incubations.
- Le portoir n'a pas été correctement agité.

Bruit de fond important

- CON-C et/ou SUB-C trop concentré.
- Les étapes de lavage n'ont pas été correctement effectuées.
- Les solutions de lavage étaient trop froides lors de leur utilisation.

Composition du Kit

	Quantité	
Bandelettes sensibilisées avec les sondes spécifiques (STRIPS)	12	96
Mélange PN (PNM) contient amorces spécifiques, nucléotides, colorant	0,5 ml	4 ml
Solution de Dénaturation (DEN) ***prêt à l'emploi*** contient <2% NaOH, colorant	0,3 ml	2,4 ml
Solution d'Hybridation (HYB) ***prêt à l'emploi*** contient 8–10% de détergent anionique, colorant	20 ml	120 ml

les bandelettes.

3. **Ajouter dans chaque puit 1 ml de Tampon d'Hybridation (HYB, vert) préchauffé et homogénéisé. Homogénéiser jusqu'à ce que le mélange devienne une couleur homogène.**
   Eviter les éclaboussures vers les autres puits.
4. **Déposer une bandelette dans chaque puit utilisé.**
   Les bandelettes doivent être entièrement recouvertes par le liquide, avec la face sensibilisée (identifiable par la ligne de repère) tournée vers le haut. Les bandelettes mal orientées doivent être remises en position à l'aide de pincettes propres. Afin d'éviter toute contamination, bien nettoyer les pincettes après chaque utilisation. Cella vaut aussi pour tous les étapes suivantes.
5. **Placer la plaque dans bain-marie agitateur/TwinCubator® et incuber 30 minutes à 45°C.**
   Pour le bain-marie agitateur sélectionner une fréquence d'agitation suffisante pour assurer un bon brassage de tampon. Ajuster le niveau de l'eau dans le bain-marie agitateur à mi-hauteur des puits de façon à assurer un bon transfert de chaleur. Cela vaut aussi pour tous les étapes suivantes.
6. **Aspirer le contenu des puits.**
   Utiliser par exemple une pipette pasteur reliée à une pompe à vide.
7. **Ajouter à chaque puit 1 ml de Solution de Lavage Stringent (STR, rouge) et incuber 15 minutes à 45°C dans bain-marie agitateur/TwinCubator®.**
8. **A partir de cette étape, travailler à température ambiante.**
   Eliminer la Solution de Lavage Stringent.
   Vider la Solution de Lavage Stringent dans un container à déchets. Eliminer tout le liquide résiduel en retournant les puits sur du papier absorbant (effectuer de même pour les autres étapes de lavage).
9. **Laver chaque puit avec 1 ml de Solution de Rinçage (RIN) et incuber pendant une minute sous agitation. Vider la Solution de Rinçage.**
10. **Ajouter à chaque puit 1 ml de Conjugué dilué (voir ci-dessus) et incuber sous agitation 30 minutes.**
11. **Vider le contenu des puits et rincer sous agitation 1 minute à l'aide de 1 ml de Solution de Rinçage (RIN). Vider RIN. Répéter ce rinçage une nouvelle fois, puis rincer une fois avec environ 1 ml d'eau distillée à l'aide d'une pissette.**
    Bien éliminer toute trace d'eau dans les puits après cette dernière étape.
12. **Ajouter 1 ml de Substrat dilué (voir ci-dessus) dans chaque puit et incuber sans agitation à l'obscurité.**
    Le temps de révélation peut varier en fonction des conditions de déroulement du test (de 3 à 20 minutes), notamment de la température de la pièce. Des temps de révélation trop longs peuvent entrainer un bruit de fond qui peut géner l'interprétation des résultats.
13. **Arrêter la réaction en rinçant brièvement deux fois à l'eau distillée.**
14. **A l'aide de pincettes, récupérer les bandelettes et les sécher entre deux couches de papier absorbant.**

Lecture et Interprétation des Résultats

Classer et ranger les bandelettes à l'abri de la lumière. Une feuille de lecture est fournie avec le kit, mais peut également être téléchargée à l'adresse suivante : http://www.hain-lifescience.de/pdf/md_evaluation.pdf
La matrice fournie avec la trousse permet d'identifier chaque zone réactionnelle par superposition. Chaque bandelette comprend 7 zones réactionnelles (voir figure).

Contrôle Conjugué (CC)
Une ligne colorée doit se développer dans cette zone. Cette ligne témoigne de la bonne fixation du conjugué et du bon déroulement de la révélation.

Contrôle Amplification (AMP-C)
Le développement d'une ligne dans cette zone confirme le bon déroulement de l'amplification (cf paragraphe Contrôle de Qualité).
Le seuil de détection pour chacune des cinq espèces bactériennes correspond à leur seuil de pathogénicité.

Solution de Lavage Stringent (STR) ***prêt à l'emploi*** contient >25% d'un sel d'ammonium quaternaire, <1% détergent anionique, colorant	20 ml	120 ml
Solution de Rinçage (RIN) ***prêt à l'emploi*** Milieu tamponné, <1% NaCl, <1% de détergent anionique	50 ml	360 ml
Conjugué Concentré (CON-C) ***concentré*** contient de la phosphatase alcaline conjugué à la streptavidine, colorant	0,2 ml	1,2 ml
Tampon Conjugué (CON-D) Milieu tamponné, 1% agent bloquant, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Substrat Concentré (SUB-C) ***concentré*** contient Dimethyl Sulfoxide, composé chromogénique	0,2 ml	1,2 ml
Tampon Substrat (SUB-D) Milieu tamponné, <1% NaCl, <1% $MgCl_2$	20 ml	120 ml
portoir, feuille de lecture	1 de chaque	4 de chaque
manuel d'utilisation, matrice	1 de chaque	1 de chaque

Matériel Requis mais Non Fourni

- Bain-marie agitateur/**TwinCubator**®
- Chronomètre
- Eau distillée
- Embouts de pipettes (de préférence stériles avec filtre)
- Eprouvette
- Gants à usage unique
- Papier absorbant
- Pincettes
- Pipettes réglables pour 10, 20, 200, et 1000 µl
- Plateau agitateur
- Thermomètre calibré

Données Techniques

Echantillon requis:	Prélèvement subgingivaux
Volume nécessaire:	20 µl de solution d'ADN amplifié par échantillon
Durée du test:	approximativement 2 heures
Conservation:	2–8°C; pour conserver >4 semaines, le mélange PN doivent être conservés à –20°C

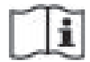
Art. No.: 232 12 tests
Art.-Nr.: 23296 96 tests

Fabricant

Hain Lifescience GmbH, Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Allemagne
http://www.hain-lifescience.de







Packungsbeilage lesen
consult operating instructions
Consulter le manuel d'utilisation



Chargennummer
batch code
Numéro de lot



Positivkontrolle
positive control
Contrôle positif



Temperaturbereich
temperature limitation
Limite de température



Haltbar bis
use by
A utiliser avant



Bestellnummer
catalogue number
Référence



Nur für den *in vitro*-Gebrauch
for *in vitro* use only
Pour usage *in vitro* uniquement